

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-519476**(P2004-519476A)**(43) 公表日 **平成16年7月2日(2004.7.2)**(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 37/02

4 C O 8 4

A 6 1 M 25/00

A 6 1 M 25/00

4 2 O B

4 C 1 6 7

A 6 1 M 29/02

A 6 1 M 29/02

A 6 1 M 37/00

A 6 1 M 37/00

A 6 1 P 7/02

A 6 1 P 7/02

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2002-567275 (P2002-567275)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月22日 (2002.2.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月22日 (2003.8.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/005157
 (87) 国際公開番号 W02002/067907
 (87) 国際公開日 平成14年9月6日 (2002.9.6)
 (31) 優先権主張番号 60/270, 759
 (32) 優先日 平成13年2月22日 (2001.2.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503304337
 シンピオテック・ゲゼルシャフト・ミット
 ・ベシュレンクター・ハフツング
 ドイツ国 ザールブリュケン 6 6 1 2 3
 シュツールザツェンハウゼンパーク 6
 9
 (71) 出願人 503304371
 フィラデルフィア・ヘルス・アンド・エジ
 ュケーション・コーポレーション
 アメリカ合衆国 1 9 1 0 2 ペンシルベ
 ニア フィラデルフィア ブロード・アン
 ド・ワイン・ストリート
 (74) 代理人 100096231
 弁理士 稲垣 清

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板凝集防止用組成物及び方法

(57) 【要約】

ヒストン化合物により、血小板凝集を防止しかつ心臓血管の疾患を治療するための組成物及び方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

効果的な量のヒストン化合物と薬学的に受け入れられる媒介物を患者に投与することを含んで成る患者中の血小板凝集防止方法。

【請求項 2】

ヒストン化合物が、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3 又は H 4 を含んで成る請求項 1 の方法。

【請求項 3】

H 1 ヒストンがヒストンサブタイプ H 1. 0、H 1. 1、H 1. 2、H 1. 3、H 1. 4 又は H 1. 5 である請求項 2 の方法。

【請求項 4】

ヒストン化合物が、遺伝子組換えにより生産される請求項 1 の方法。

【請求項 5】

ヒストン化合物がヒトヒストンである請求項 1 の方法。

【請求項 6】

ヒストン化合物が予防的に投与される請求項 1 の方法。

【請求項 7】

効果的な量のヒストン化合物を患者に投与することを含んで成る血栓症の事象に関連する患者中の心臓血管の障害を治療する方法。

【請求項 8】

ヒストン化合物と薬学的に受け入れられる媒介物を含んで成る血小板凝集防止用組成物。 20

【請求項 9】

ヒストン化合物が、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3 又は H 4 を含んで成る請求項 8 の組成物。

【請求項 10】

H 1 ヒストンがヒストンサブタイプ H 1. 0、H 1. 1、H 1. 2、H 1. 3、H 1. 4 又は H 1. 5 である請求項 9 の組成物。

【請求項 11】

ヒストン化合物が、遺伝子組換えにより生産される請求項 8 の組成物。

【請求項 12】

ヒストン化合物で被覆され、患者の身体内に挿入されるデバイスを含んで成る埋め込み可能なデバイス。 30

【発明の詳細な説明】

発明の背景

抗血小板及び抗血栓症の治療方式の進展にかかわらず、心臓血管の疾患はアメリカ合衆国では依然として主要な死亡原因である。臨床的に使用される抗血小板及び抗血栓症の薬剤は、ヘパリン、アスピリン、インテグリン及び抗 GP IIb/IIIa 抗体 (c7E3 Fab、アブキシマブ又は ReoPro) を含む。体内の管が損傷したサイトで発生する α-トロンビン是一般に、ヒト血小板 7-膜透過型トロンビン受容体、蛋白質分解酵素活性受容体 1 (PAR-1) からの N-末端ペプチドの加水分解を触媒すると考えられ、これは血栓形成に導かれる分子反応のカスケードを開始する。 40

細胞のトロンビン受容体の初期の研究は、血小板中に 2 以上の種が存在することを示した (N. J. グレコ及び G. A. ジャミーソン、1991、P S E B M 198: 792-799; J. T. ハルモン及び G. A. ジャミーソン、1996、J. B i o . C h e m . 261: 15928-15933)。クローン化されシーケンス化された第 1 の細胞のトロンビン受容体は PAR-1 であった (T-K. H. ブーラ、1991、C e l l 64: 1057-1068)。ヒト血小板は PAR-1 及び第 2 のマイナーな受容体 PAR-4 の活性化に応答し (M. L. カーンら、1998、N a t u r e 394: 690-694)、最近クローン化された PAR-3 はヒト血小板には存在しないか、痕跡量が存在するかのいずれかである (H. イシハラ、1997、N a t u r e 386: 502-506)。マウスの血小板は、PAR-1 を巻き込まずに、主に PAR-3 を通してか 50

つ補助的にPAR-4を通して α -トロンビンに応答する(T-K, H. ブーら、1991、Cell 64:1057-1068)。他の血小板膜蛋白GP Ibも少なくとも部分的にトロンビン受容体として機能する(N. J. グレコ及びG. A. ジャミーソン、1991、PSEBM 198:792-799; J. T. ハルモン及びG. A. ジャミーソン、1996、J. Bio. Chem. 261:15928-15933、K. J. クレメトソン、1995、Thromb. Haemost. 74:111-116及びN. J. グレコら、1996、Biochemistry 35:915)。

3種類の血小板トロンビン受容体(PAR-1、PAR-4及びGP Ib)を意味するものの生理的な機能は、未だ明確には特徴付けられていない。 α -トロンビンが誘発する血小板凝集におけるPAR-1の機能的な役割が試験管内で示された(T-K, H. ブーら、1991、Cell 64:1057-1068)。ヒト血小板は、PAR-4の活性化を通して、 α -トロンビンの自己分解生成物である γ -トロンビンに応答することが示された。しかし、抗血栓症及び抗血栓症治療とGP Ib及び/又はPAR-4受容体との相互関係は記載されていない。

ヒストンは、DNAのパッケージング、転写及び複製に關与する核蛋白である(I. アイセンベルク、1979、Ann. Rev. Biochem. 48:159-191)。これらは機能的な細胞膜の天然に存在する必須成分である(K. ワトソンら、1994、Biochem. Soc. Trans. 22:199S; K. ワトソンら、1995、Biochem. Pharmacol. 50:299-309)。過去数年、ヒストンが細胞核の外で、そして細胞の外でさえも更に多くの機能を有することが見出されている。例えば細胞が悪性の形質変換を受けてガン細胞になると、該細胞の分子構造が乱されてその結果細胞膜中に高いパーセンテージでヒストン分子が生じる(R. クラスら、1996、Am. J. Clin. Oncol. 19:522-531)。ヒストンは標準的な膜蛋白と、それらがそれらを脂質二重層システム中に挿入できる疎水性のコアと親水性のC-及びN-末端を有するという点で同質性を共有している。ヒストンのコア領域は、ヒストン・フォールド・モティーフと呼ばれる α -ヘリックスと β -シートの円筒状シーケンスから成っている。このモティーフは蛋白質のオリゴマー化やチャンネル形成に使用される(アレンツら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11170-11174)。

通常の配向性が変化すると、ヒストン分子は他のヒストン分子とともにより高オーダーの錯体を形成するポテンシャルを有するようになり、最終的には膜中に致命的になりかねないチャンネルを形成する。このようなチャンネル形成はフレンドの赤白血病及びジュルカトの腹水腫瘍細胞中に示されている(ガンベッルチら、1998、Biochem. J. 331:623-630)。ヒストンH1は、アニオン性のリン脂質を含む人工的な細胞膜に強固に結合することが示されている(A. コイブラ、1995、Biochemistry 34:8018-8027; E. M. ゴールドベルクラ、1998、Eur. J. Biochem. 258:722-728; M. スブラマニアンら、1998、Biochemistry 37:1394-1402)。同様の結果が、システムの紅斑性ループス、ヒストンH1を含む自己免疫性の疾患の患者でも報告されている(ペレイラら、1994、Clin. Exp. Immunol 97:175-180)。ガン細胞の膜中の決定的に重要ではない量のヒストン分子は、細胞外ヒストンH1添加によるオリゴマー化及び致命的なチャンネル形成を開始させることができる。従って細胞溶解は、細胞外から添加される遊離のヒストンH1の量により臨床的に制御できると考えられる。

ヒストン蛋白のファミリーは、コアヒストンH2A、H2B、H3及びH4とリンカーヒストンH1を含む5種類から成っている。ヒストンH1は低い免疫原性と抗原性を有し、起こりそうのない出来事ではあるが、ヒストンH1が注入された患者中に中和抗体を生産する。ヒストンH1は血液脳関門を阻害するために使用でき、かつ脳転移の治療に使用されてきた(パトリッジら、1989、J. Pharmacol. Exp. Ther. 251:821-826)。

H 1 のようなヒストンは γ -トロンビンにより誘発される血小板凝集を特異的に阻止する能力を有することが見出された。

発明の概要

本発明の目的は、効果的な量のヒストン化合物を投与することを含んで成る血小板凝集防止方法を提供することである。

本発明の他の目的は、ヒストン化合物と薬学的に受け入れられる媒介物を含んで成る血小板凝集防止用組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、ヒストン化合物と薬学的に受け入れられる媒介物を含んで成る効果的な量の組成物を投与することを含んで成る血栓症の事象に関連する心臓血管の障害を治療する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、ヒストン化合物で被覆され、患者の身体内に挿入されるデバイスを含んで成る埋め込み可能なデバイスを提供することである。

発明の詳細な説明

臨床データは、抗血栓症薬を摂取している患者は依然として再発の被害を被り、従って血管中の血小板凝集を誘発する活性な他の経路があることを示している。試験管中で行われた試験は、 γ -トロンビン経路が抗血小板又は抗血栓症治療を受けている患者中で依然として活性で、血栓症の応答の少なくとも部分的な原因であることを示している。ヒストン化合物を含んで成る組成物は、 α -トロンビンにより仲介される血小板凝集と互いに邪魔することなく、 γ -トロンビンにより誘発される血小板凝集を特異的にかつ効果的に阻止する能力を有することが見出された。

本発明は、血小板凝集の阻止用及び血栓症の事象に関連する心臓血管の障害の治療のための組成物及び方法に関する。本発明の組成物は、直接ヒトを含む動物に使用され、又は血管、心臓又は脳中に埋め込まれる医学用デバイス用のコーティングとして使用される、薬学的に受け入れられる媒介物中に含まれて投与される少なくとも 1 種のヒストン化合物から成る。前記ヒストン化合物は、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3 又は H 4 ヒストンを含んで成っていても良い。好ましい態様では、ヒストン化合物は H 1 ヒストンを含んで成る。該ヒストン H 1 は、H 1. 0、H 1. 1、H 1. 2、H 1. 3、H 1. 4 又は H 1. 5 のようなヒストンサブタイプでも良い。好ましい態様では、ヒストンはヒトヒストンである。他の好ましい態様では、ヒストンは遺伝子組換えにより生産される。好ましい態様では、薬学的に受け入れられる媒介物が生理食塩水を含んで成る。本発明は、更に少なくとも 1 種のヒストンを含んで成る組成物の投与を含んで成る血小板凝集阻止用及び血栓症の事象に関連する心臓血管の障害の治療のための方法を提供する。

抗血栓症薬としてのヒストン H 1 を含んで成る組成物の役割を調べる研究が行われた。血小板凝集アッセイを、溶液中での大きな血小板凝集体として増加している光伝達を追跡する血小板凝集計を使用して行った。 γ -トロンビンは補助因子の存在下で血小板凝集を迅速に誘発させた。(9. 5 μ M の貯蔵された溶液からの) ヒストン H 1 を含んで成る組成物を 5 μ l 添加したところ、観察時間内で血小板の凝集は大きく減少した。より大きい投与量である 25 μ l の (9. 5 μ M の貯蔵された溶液からの) ヒストン H 1 を投与したところ、血小板凝集は無くなった。

γ -トロンビン自身に替えて、 γ -トロンビン模倣薬である T R A P - 4 (トロンビン受容体アゴニストペプチド-4) を使用して付加的な実験を行った。T R A P - 4 は低いレベルの血小板凝集応答を生じさせた。しかしヒストン H 1 を含んで成る組成物を添加したところ、T R A P - 4 で誘発される血小板凝集のレベルが大きく減少した。 γ -トロンビンで誘発される血小板凝集を抑制するためのヒストン H 1 を含んで成る組成物の効果は投与量に依存する。0. 95、4. 75 及び 9. 5 μ M の投与量のヒストン H 1 を試験管中の血小板細胞に添加したところ、凝集は抑制された。0. 95 μ M のみのヒストン H 1 投与量の場合でも 95 % を超える血小板凝集が抑制された。

ヒストン H 1 の相互作用の特異性を調べるための実験も行った。ヒストン H 1 を α -トロンビンで誘発された血小板凝集体に添加したが、 α -トロンビンで誘発された血小板凝集体には特筆すべき効果は生じなかった。これらの結果は、ヒストン H 1 の相互作用は γ -

10

20

30

40

50

トロンビンの経路に対して特異的であることを示している。

H 2 A、H 2 B、H 3 及び H 4 のような他のヒストン化合物を研究したところ、これらのヒストン化合物はヒストン H 1 に類似した活性を有することを示している。更にヒストン H 1、及び H 1. 0、H 1. 1、H 1. 2、H 1. 3、H 1. 4 又は H 1. 5 のようなヒストン H 1 サブタイプも両者とも血小板凝集を防止することに成功した。本発明の組成物は、溶液として摂取又は注射され、又は経口投与用のピルの形態として薬学的に受け入れられる媒介物中に配合されたヒストン化合物を含んで成る。ヒストン化合物による本発明ではその趣旨から、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3 及び H 4 ヒストンに限定されないがこれらを含むほか、ヒストンサブタイプ、ヒストンフラグメント、遺伝子組換えにより生産されたヒストン、不完全なヒストン、従来のアミノ酸で置換されたヒストン、ヒストンの主要な及び／又は二次的な構造を変化させないヒストンへの修正（例えばグリコシル化、リン酸化、メチル化、ペギレーション）、D-アミノ酸を含むヒストン、及び他の物質に縮合又は結合されたヒストンに限定されないがこれらを含む。例えば H 1 ヒストンに関して有用なサブタイプはこれらに限定されないが、H 1. 0、H 1. 1、H 1. 2、H 1. 3、H 1. 4 及び H 1. 5 を含む。溶液中の組成物は、静脈注射、筋肉注射により、あるいは皮下や腹膜に注入され、あるいは直接眼や筋肉の染み込ませることができる。

血栓症の事象に関連する患者の心臓血管の障害は、前記患者に効果的な量のヒストン化合物を投与することにより治療できる。更にヒストン化合物を含んで成る本発明の組成物は、高いリスクで血栓症の症状が発見される患者に対して予防用として与えられる。例えば本発明の組成物は、ヘパリンのような標準的な治療の代わりに外科的処置の後に患者に投与できる。当業者は当分野の周知の技術に従って本発明の組成物を投与できる。更に当業者は本明細書に提示した実験データに基づいて投与されるべきヒストン化合物の効果的な量を通常通りに選択できる。細胞中の効果的な量から生体内に投与されるべき投与量を推定することは、当業者により通常通り行われる。

ヒストン化合物はステント又はバルブのような埋め込み可能なデバイスを被覆するためにも使用され、又はカテーテルのような短期又は長期で患者の体内に挿入されるデバイスの被覆に使用できる。本発明では、その趣旨から、埋め込み可能なデバイスは、短期又は長期にかかわらず任意の時間、血管や心臓内に位置させるデバイスを含む。被覆の調製のために、ヒストン化合物は生理的に受け入れられるマトリックス中に配合される。その趣旨から、本発明における生理的に受け入れられるマトリックスは、免疫システムに対して外来性とは認識されずかつ生物学的適合性を有する（炎症や、免疫原性又は炎症性の応答を生じさせない物質）ものである。

本発明を更に説明するために、次に限定を意図しない実施例を記載する。

実施例

実施例 1：血栓症凝集アッセイ

既知の技術（G. ソスラウ及び J. ジレス、1982、Thrombos. Res. 26：443-455）に従って、血液を、静脈に開けた穴から 1/10 容量の 3.8% のクエン酸塩を含むプラスチック管中に導入し、血小板リッチなプラズマ（PRP）を調製した。血液サンプルは薬物治療を受けていない健康な提供者から得た。洗浄した血小板を既知の方法（A. R. バッシャーら、1995、Biochim. Biophys. Acta 1250：97-109）で前記 PRP から調製した。簡単にいうと、PRP を、3 容量部の 100 nM のクエン酸塩緩衝液（pH 6.0）に 1 から 2 容量部のヘ pes・チロードの緩衝液（pH 7.4）を加えたもので希釈して最終容量が 50 ml になるようにし、1 mg/ml のデクストロースと 1 mg/ml のウシ血清アルブミンを加えたヘ pes・チロードの緩衝液中に $2 \times 10^6 / \mu\text{l}$ から $3 \times 10^6 / \mu\text{l}$ （10X 規定濃度）となるように再懸濁させた。

既知の方法（G. ソスラウら、1988、Biochem. Biophys. Res. Commun. 15：909-916）により、デュアル・チャンネルのクロノログ・ルミ血小板凝集計（ペンシルベニア州ハーバタウンのクロノログ・コーポレーション製）を使用して血小板凝集を行った。480 μl の洗浄した血小板、つまり 50 μl の濃縮

した血小板のサンプルを $430\text{ }\mu\text{l}$ のヘペス・チロードの緩衝液中に加えて最終の血小板
カウント数が $2 \times 10^5 / \mu\text{l}$ から $3 \times 10^5 / \mu\text{l}$ となるようにしたものを使用して凝
集を行った。作用薬と拮抗薬を種々の濃度で添加した。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/067907 A1(51) International Patent Classification: A61K 9/70, 9/22,
31/00, 51/08, 9/50, A61F 2/00, B01J 13/08, C12N 11/02SOSLAU, Gerald [US/US]; 509 Grandview Avenue,
Feasterville, PA 19053 (US); ZEPPEAUER, Michael
[DE/DE]; Auf den Hütten 32, 66133 Saarbrücken (DE).

(21) International Application Number: PCT/US02/05157

(74) Agents: LICATA, Jane, Massey et al.; Licata & Tyrrell
P.C., 66 E. Main Street, Marlton, NJ 08053 (US).

(22) International Filing Date: 22 February 2002 (22.02.2002)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/270,759 22 February 2001 (22.02.2001) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application: 60/270,759 (CIP)
US
Filed on 22 February 2001 (22.02.2001)(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(71) Applicants (for all designated States except US):
PHILADELPHIA, HEALTH AND EDUCATION
CORPORATION [US/US]; Broad and Vine Streets,
Philadelphia, PA 19102 (US); SYMBIOTEC GMBH
[DE/DE]; Stuhlsitzenhofweg 69, 66123 Saarbrücken
(DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CLASS, Reiner
[DE/US]; 53-7 Revere Road, Drexel Hill, PA 19026 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/067907 A1

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTING PLATELET AGGREGATION

(57) Abstract: Compositions and methods for preventing platelet aggregation and treating cardiovascular disease via histone com-
pounds are provided.

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 1 -

COMPOSITIONS AND METHODS FOR
PREVENTING PLATELET AGGREGATION

BACKGROUND OF THE INVENTION

Despite advances in anti-platelet and anti-thrombotic
5 treatment regimens, cardiovascular diseases remain the
leading cause of death in the United States. Clinically
employed anti-platelet and anti-thrombotic agents include
heparin, aspirin, integrilin, and anti-GP IIb/IIIa
antibodies (c7E3 Fab, abciximab, or ReoPro). α -Thrombin,
10 generated at the site of vessel injury, is generally
assumed to catalyze the hydrolysis of an N-terminal peptide
from the human platelet 7-transmembrane thrombin receptor,
protease activated receptor 1 (PAR-1), which initiates a
cascade of molecular reactions leading to thrombus
15 formation.

Early studies of the cellular thrombin receptor
indicated that more than one species exists in platelets
(Greco, N.J. and G.A. Jamieson. 1991. *PSEBM* 198:792-799;
Harmon, J.T. and G.A. Jamieson. 1986. *J. Biol. Chem.*
20 261:15928-15933). The first cellular thrombin receptor
cloned and sequenced was PAR-1 (Vu, T-K.H. et al. 1991.
Cell 64:1057-1068). Human platelets respond to the
activation of PAR-1 and a second minor receptor PAR-4
(Kahn, M.L. et al. 1998. *Nature* 394:690-694) while the
25 recently cloned PAR-3 is either absent on human platelets
or present in trace amounts (Ishihara, H. et al. 1997.
Nature 386:502-506). Mouse platelets respond to α -thrombin
primarily through PAR-3 and secondarily through PAR-4, with
no involvement of PAR-1 (Vu, T-K.H. et al. 1991. *Cell*
30 64:1057-1068). Another platelet membrane protein, GP Ib,
may also function at least in part as a thrombin receptor
(Greco, N.J. and G.A. Jamieson. 1991. *PSEBM* 198:792-799;
Harmon, J.T. and G.A. Jamieson. 1986. *J. Biol. Chem.*

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 2 -

261:15928-15933; Clemetson, K.J. 1995. *Thromb. Haemost.*
74:111-116; Greco, N.J. et al. 1996. *Biochemistry* 35:915).

The physiologic functions of the three purported
platelet thrombin receptors (PAR-1, PAR-4 and GP Ib) have
not yet been clearly defined. A functional role for PAR-1
5 in α -thrombin-induced platelet aggregation has been shown
in vitro (Vu, T-K.H. et al. 1991. *Cell* 64:1057-1068).
Human platelets have been shown to respond to γ -thrombin,
an autoproteolytic product of α -thrombin, through
10 activation of PAR-4. However, the interactions of anti-
thrombotic and anti-platelet therapies with the GP Ib
and/or PAR-4 receptor have not been described.

Histones are nuclear proteins involved in DNA
packaging, transcription and replication (Isenberg, I.
15 1979. *Ann. Rev. Biochem.* 48:159-191). They are naturally
occurring integral components of functional cell membranes
(Watson, K. et al. 1994. *Biochem. Soc. Trans.* 22:199S;
Watson, K. et al. 1995. *Biochem. Pharmacol.* 50:299-309).
In the past few years, histones have been found to have
20 many more functions outside of the nucleus and even outside
the cell. For example, It has been shown that if a cell
undergoes a malignant transformation to a cancer cell, the
molecular makeup of the cell is disturbed resulting in a
higher percentage of histone molecules in the cell membrane
25 (Class, R. et al. 1996. *Am. J. Clin. Oncol.* 19:522-531).
Histones share homology with classic membrane proteins in
that they have a hydrophobic core and hydrophilic C- and N-
terminal tails allowing them to insert into the lipid
bilayer system. The core domain of histones are composed
30 of cylinder-shaped sequences of α -helices and β -sheets
called the histone fold motif. This motif is used in
protein oligomerization and channel formation (Arents, et
al. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11170-11174).

If normal orientations are changed, histone molecules
35 have the potential to form higher-order complexes with

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 3 -

other histones, ultimately resulting in the formation of a potentially lethal channel in the membrane. Such channel formation has been demonstrated in Friend erythroleukemia and Jurkat and ascites tumor cells (Gamberrucci et al. 1998. *Biochem. J.* 331:623-630). Histone H1 has been shown to bind strongly to artificial cell membranes containing anionic phospholipids (Koiv, A. et al. 1995. *Biochemistry* 34:8018-8027; Goldberg, E.M. et al. 1998. *Eur. J. Biochem.* 258:722-728; Subramanian, M. et al. 1998. *Biochemistry* 37:1394-1402). Similar results have been reported in patients with systemic lupus erythematosus, an autoimmune disease involving histone H1 (Pereira et al. 1994. *Clin. Exp. Immunol.* 97:175-180). The sub-critical amount of histone molecules in the membrane of cancer cells can be induced to turn on oligomerization and lethal channel formation by the addition of extracellular histone H1. Cell lysis, therefore, appears to be critically controlled by the amount of extracellularly added free histone H1.

The family of histone proteins consists of five members including the core histones H2A, H2B, H3 and H4 and the linker histone H1. Histone H1 has a low immunogenicity and antigenicity, making generation of neutralizing antibodies in patients injected with histone H1 to be an unlikely event. Histone H1 can be used to cross the blood-brain barrier and has been used to treat brain metastases (Partridge et al. 1989. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251:821-826).

It has now been found that histones such as H1 have the ability to specifically block γ -thrombin-induced platelet aggregation.

SUMMARY OF THE INVENTION

An object of the present invention is to provide a method for preventing platelet aggregation comprising

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 4 -

administering an effective amount of a histone compound.

Another object of the present invention is to provide a composition for preventing platelet aggregation comprising a histone compound and a pharmaceutically

5 acceptable vehicle.

Another object of the present invention is to provide a method for treating cardiovascular disorders related to thrombotic events comprising administering an effective amount of a composition comprising a histone compound and a

10 pharmaceutically acceptable vehicle.

Another object of the present invention is to provide an implantable device comprising a device to be inserted into the body of a patient said device being coated with a histone compound.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Clinical data has demonstrated that patients taking anti-thrombosis drugs still suffer from relapses, thus indicating that another pathway is active that can induce platelet aggregation in blood vessels. Experiments

20 performed *in vitro* suggest that the γ -thrombin pathway may still be active in patients undergoing anti-platelet or anti-thrombotic therapy, and may be responsible for at least part of the thrombotic response. It has now been found that a composition comprising a histone compound has

25 the ability to specifically and effectively block γ -thrombin-induced platelet aggregation without interfering with platelet aggregation mediated by alpha-thrombin.

The present invention relates to compositions and methods for prevention of platelet aggregation and for

30 treatment of cardiovascular disease related to thrombotic events. Compositions of the present invention are comprised of at least one histone compound administered in a pharmaceutically acceptable vehicle directly to an animal, including humans, or used as a coating for medical devices

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 5 -

implanted in blood vessels or the heart or brain. The histone compound may comprise a H1, H2A, H2B, H3 or H4 histone. In a preferred embodiment the histone compound comprises a H1 histone. The H1 histone may be a H1 subtype
5 such as, H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, or H1.5. In a preferred embodiment the histone is a human histone. In another preferred embodiment, the histone compound is recombinantly produced. In a preferred embodiment, the pharmaceutically acceptable vehicle comprises isotonic
10 saline. The present invention also provides methods for preventing platelet aggregation and for treating cardiovascular disease related to thrombotic events which comprise administration of a composition comprising at least one histone.

15 Studies were performed to examine the role of a composition comprising histone H1 as an anti-thrombotic agent. Platelet aggregation assays were performed in an aggregometer that monitors increasing light transmission as larger platelet aggregates form in solution. γ -Thrombin
20 rapidly induced platelet aggregation in the presence of cofactors. Addition of 5 μ l of a composition comprising histone H1 (from a 9.5 μ M stock solution) significantly reduced the aggregation of platelets within the observation time period. Administration of a larger dose, 25 μ l
25 histone H1 (from a 9.5 μ M stock solution) completely abolished platelet aggregation.

Additional experiments were performed with a γ -thrombin mimetic agent, TRAP-4 (Thrombin Receptor Agonist Peptide-4) instead of γ -thrombin itself. TRAP-4 produced a
30 lower level platelet aggregation response. However, addition of a composition comprising histone H1 significantly reduced the level of platelet aggregation induced by TRAP-4.

The effects of a composition comprising histone H1 to
35 inhibit γ -thrombin-induced platelet aggregation were dose-

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 6 -

dependent. When doses of 0.95, 4.75 and 9.5 μ M histone H1 were added to platelet cells *in vitro*, aggregation was inhibited. a dose of only 0.95 μ M histone H1 caused a greater than 95% inhibition of platelet aggregation.

5 Experiments were also performed to examine the specificity of the interaction of histone H1. When histone H1 was added to α -thrombin-induced platelet preparations, there was no significant effect on α -thrombin-induced platelet aggregation. These results indicate that the
10 interaction of histone H1 is specific for the γ -thrombin pathway.

Studies with other histone compounds such as H2A, H2B, H3, and H4 are indicative of these histone compounds having similar activity to histone H1. Further the histone
15 H1 and histone H1 subtypes such as, H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 and H1.5, were both successful in preventing platelet aggregation. Compositions of the present invention comprise a histone compound formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle for ingestion or
20 injection as a solution or as a pill form for oral administration. In the context of the present invention by histone compound, it is meant to be inclusive of, but is not limited to the H1, H2A, H2B, H3 and H4 histones, as well as analogs of histones including but not be limited to
25 histone subtypes, histone fragments, recombinantly produced histones, truncated histones, histones with conservative amino acid substitutions, modifications to histones that do not alter the primary and/or secondary structure of the histone (e.g., glycosylation, phosphorylation, methylation,
30 pegylation), D-amino acid-containing histones, and histones fused or linked to other agents. For example, for the H1 histone, useful subtypes include, but are not limited to H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 and H1.5. Compositions in solution can be injected intravenously, intramuscularly,
35 subcutaneously, intraperitoneally, or instilled directly

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 7 -

into the eye or muscosal areas.

Cardiovascular disorders in patients relating to thrombotic events may be treated by administering an effective amount of a histone compound to the patient.

5 Further, compositions of the present invention comprising a histone compound can be given prophylactically to patients at high risk of thrombotic episodes. For example, a composition of the present invention can be administered to a patient following surgery *in lieu* of standard treatments
10 such as heparin. One of skill can administer the compositions of the present invention in accordance with well known techniques in the art. Further, one of skill can routinely select an effective amount of a histone compound to be administered based upon the experimental
15 data provided herein. Extrapolation from effective amounts in cells to doses to be administered *in vivo* is performed routine by those skilled in the art.

Histone compounds can also be used to coat implantable devices such as stents or valves, or to coat
20 devices inserted in the body of a patient for either short or prolonged periods such as catheters. In the context of the present invention an implantable device would include devices that are placed inside the blood vessels or the heart for any amount of time, either short-term or long-
25 term. To prepare the coating, the histone compound is formulated in a physiologically acceptable matrix. In the context of the present invention a physiologically acceptable matrix is one that is not recognized as foreign to the immune system and is biocompatible (a substance that
30 does not produce any irritation, immunogenic, or inflammatory response).

The following non-limiting examples are provided to further illustrate the present invention.

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 8 -

EXAMPLES

Example 1: Platelet Aggregation Assay

Blood was drawn by venopuncture into plastic tubes that contained 1/10 volume 3.8% citrate and platelet-rich plasma (PRP) was prepared in accordance with known techniques (Soslau, G. and J. Giles. 1982. *Thrombos. Res.* 26:443-455). Blood samples were obtained from healthy donors who were medication free. Washed platelets were prepared from the PRP by known methods (Basheer, A.R. et al. 1995. *Biochim. Biophys. Acta* 1250:97-109). Briefly, PRP was diluted with 3 volumes of 100 mM citrate buffer (pH 6.0) plus 1 to 2 volumes of hepes Tyrode's buffer (pH 7.4), final volume of 50 ml, and resuspended in hepes Tyrode's buffer with 1 mg/ml dextrose plus 1 mg/ml bovine serum albumin at $2 \times 10^6/\mu\text{l}$ to $3 \times 10^6/\mu\text{l}$ (a 10X normal concentration).

Platelet aggregations were performed on a dual-channel Chronolog lumi aggregometer (Chronolog Corp., Havertown, PA) by known methods (Soslau, G. et al. 1988. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15:909-916). Aggregations were conducted with 480 μl washed platelets or a 50 μl sample of the concentrated platelets added to 430 μl hepes Tyrode's buffer with a final platelet count of $2 \times 10^5/\mu\text{l}$ to $3 \times 10^5/\mu\text{l}$. Agonists and antagonists were added at various concentrations.

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 9 -

What is claimed is:

1. A method for preventing platelet aggregation in
a patient comprising administering an effective amount of a
histone compound and a pharmaceutically acceptable vehicle
5 to a patient.
2. The method of claim 1 wherein the histone
compound comprises H1, H2A, H2B, H3 or H4.
3. The method of claim 2 wherein the H1 histone is
a histone subtype H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, or H1.5
- 10 4. The method of claim 1 wherein the histone
compound is recombinantly produced.
5. The method of claim 1 wherein the histone
compound is human.
6. The method of claim 1 wherein the histone
15 compound is administered prophylactically.
7. A method for treating cardiovascular disorders
in a patient related to thrombotic events comprising
administering an effective amount of a histone compound to
a patient.
- 20 8. A composition for preventing platelet
aggregation comprising a histone compound and a
pharmaceutically acceptable vehicle.
9. The composition of claim 8 wherein the histone
25 compound comprises H1, H2A, H2B, H3 or H4.
10. The composition of claim 9 wherein the H1

WO 02/067907

PCT/US02/05157

- 10 -

histone is a histone subtype H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, or H1.5

11. The composition of claim 8 wherein the histone compound is recombinantly produced.

5

12. An implantable device comprising a device to be inserted into the body of a patient said device being coated with a histone compound.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05157
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, EAST, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,607,691 A (HALE et al) 04 March 1997, col. 10, lines 52-55, col. 11, lines 22-29, col. 26, lines 22-39, col. 42-44.	2-4, 6, 8, 9-11
X	US 5,616,311 A (YEN) 01 April 1997, col. 2, lines 32-42, col. 4, lines 44-49, col. 5, lines 5-23, col. 36, line 16.	1-11
Y	US 5,126,140 A (ITO et al) 30 June 1992, col. 6 and 7.	1-12
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 MAY 2002		Date of mailing of the international search report 14 JUN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-5230		Authorized officer ALANA M. HARRIS, Ph.D. Telephone No. (703) 305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/06187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7)

A61K 9/70, 9/22, 31/00, 51/08, 9/50; A61F 2/00; B01J 13/08; C12N 11/02

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/129, 1.53, 1.57, 2.14, 2.21, 215.3, 449, 454, 499, 402.2, 402.24, 423, 422, 424, 425, 426, 435/177; 604/20, 514/1,
2, 26, 169, 183, 553, 556; 523/112, 113; 580/395; 604/20, 890.1; 935/54;

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

424/129, 1.53, 1.57, 2.14, 2.21, 215.3, 449, 454, 499, 402.2, 402.24, 423, 422, 424, 425, 426, 435/177; 604/20, 514/1,
2, 26, 169, 183, 553, 556; 523/112, 113; 580/395; 604/20, 890.1; 935/54;

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100086726

弁理士 森 浩之

(72)発明者 クラス, ライナー

アメリカ合衆国 1 9 0 2 6 ペンシルベニアドレクセル・ヒル レベイエ・ロード 5 3 - 7

(72)発明者 ソスラウ, ジェラルド

アメリカ合衆国 1 9 0 5 3 ペンシルベニア フィースタービル グランドビュー・アベニュー
5 0 9

(72)発明者 ツェッペツァウアー, ミシャエル

ドイツ国 ザールブリュケン 6 6 1 3 3 アウフ・デン・ヒュッテン 3 2

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 CA53 MA17 MA66 MA67 NA14 ZA541

4C167 AA01 AA09 AA46 AA50 AA74 BB05 CC04 CC08 CC19 GG16